

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-9986

(43) 公開日 平成9年(1997)1月14日

(51) Int.Cl. [*]	識別記号	序内整理番号	F 1	技術表示箇所
C 12 P 19/16			C 12 P 19/16	
A 23 L 1/236			A 23 L 1/236	A
A 61 K 7/00			A 61 K 7/00	F
C 07 H 3/04			C 07 H 3/04	
C 12 P 19/20			C 12 P 19/20	
審査請求 未請求 請求項の数13 FD (全29頁)				

(21) 出願番号 特願平7-204033

(71) 出願人 000155908

株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

(22) 出願日 平成7年(1995)7月19日

(72) 発明者 西本 友之

岡山県岡山市桑野525番地の3

(31) 優先権主張番号 特願平6-187901

(72) 発明者 茅園 博人

岡山県岡山市湊107番地の2

(32) 優先日 平6(1994)7月19日

(72) 発明者 杉本 利行

岡山県岡山市東唯695番44号

(33) 優先権主張国 日本 (JP)

(72) 発明者 三宅 俊雄

岡山県岡山市伊島町1丁目3番23号

(31) 優先権主張番号 特願平7-120387

(32) 優先日 平7(1995)4月24日

(33) 優先権主張国 日本 (JP)

(54) 【発明の名称】 トレハロースとその製造方法並びに用途

(57) 【要約】

【課題】 トレハロース、又は、これを含む糖質とその製造方法並びに用途を提供する。

【解決手段】 マルトースを含有せしめた栄養培地に、マルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物を培養し、得られるトレハロース、又は、これを含む糖質、該糖質の製造方法並びに該糖質を含有せしめた組成物を主な構成とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 マルトースを含有せしめた栄養培地に、マルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物を培養し、得られるトレハロース、又は、これを含む糖質。

【請求項2】 マルトースが、澱粉を液化したものに、 β -アミラーゼ又は β -アーミラーゼとともに澱粉枝切酵素を作用させて得られるマルトースである請求項1記載のトレハロース、又は、これを含む糖質。

【請求項3】 微生物が、ビメロバクター属、ショードモナス属及びサーマス属から選ばれる微生物であることと特徴とする請求項1又は2記載のトレハロース、又は、これを含む糖質。

【請求項4】 トレハロースが、含水結晶又は無水結晶である請求項1、2又は3記載のトレハロース、又は、これを含む糖質。

【請求項5】 マルトースを含有せしめた栄養培地に、マルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物を培養し、得られる培養物からトレハロース、又は、これを含む糖質を採取することと特徴とするトレハロース、又は、これを含む糖質の製造方法。

【請求項6】 栄養培地に、マルトースを20w/v%以下含有せしめることと特徴とする請求項5記載のトレハロース、又は、これを含む糖質の製造方法。

【請求項7】 栄養培地に、マルトースとともに界面活性剤を含有せしめることと特徴とする請求項5又は6記載のトレハロース、又は、これを含む糖質の製造方法。

【請求項8】 微生物が、ビメロバクター属、ショードモナス属及びサーマス属から選ばれる微生物であることと特徴とする請求項5、6又は7記載のトレハロース、又は、これを含む糖質の製造方法。

【請求項9】 培養が、回分法、連続法又は半連続法で行われることと特徴とする請求項5、6、7又は8記載のトレハロース、又は、これを含む糖質の製造方法。

【請求項10】 培養物又はこれから得られる糖質に、グルコアミラーゼ、又は α -ケルコシダーゼを使用させることと特徴とする請求項5、6、7、8又は9記載のトレハロース、又は、これを含む糖質の製造方法。

【請求項11】 マルトースを含有せしめた栄養培地に、マルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物を培養し、得られるトレハロース、又は、これを含む糖質を含有せしめた組成物。

【請求項12】 トレハロースが、含水結晶又は無水結晶である請求項11記載の組成物。

【請求項13】 組成物が、飲食物、化粧品又は医薬品であることを特徴とする請求項11又は12記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、トレハロースとそ

の製造方法並びに用途に關し、詳細には、マルトースを含有せしめた栄養培地に、マルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物を培養し、得られるトレハロース、又は、これを含む糖質、及び該糖質の製造方法並びにその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】 グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、古くからトレハロース(α -D-トレハロース)が知られており、その存在は、『アドバンシズ・イン・カーボハイドレイト・ケミストリー(Advances in Carbohydrate Chemistry)』、第18巻、第201乃至225頁(1963年)アカデミック・プレス社(米国)及び『アプライド・アンド・エンビロメンタル・マイクロバイオロジー(Applied and Environmental Microbiology)』、第56巻、第3213乃至3215頁(1990年)などにも記載されているように、少量ながら、微生物、きのこ、昆虫など広範囲に及んでいる。トレハロースのような非還元性糖質は、アミノ酸や蛋白質等のアミノ基を有する物質とアミノカルボニル反応を起こさず、含アミノ酸物質を損なわないことから、褐変、劣化を懸念することなく利用、加工ができることが期待され、その工業的製造方法の確立が望まれている。

【0003】 トレハロースの製造方法としては、例えば、特開昭50-154485公報で報告されている微生物菌体を用いる方法や、特開昭58-216695公報で提案されているマルトース・ホスホリラーゼとトレハロース・ホスホリラーゼとの組合せでマルトースを変換する方法などが知られている。しかしながら、微生物菌体を用いる方法は、該菌体を出発原料とし、これに含まれるトレハロースの含量が、通常、固形物当たり15w/w%以下(以下、本明細書では、特にことわらない限り、w/w%を単に%と略称する)未満と低く、その上、これを抽出・精製する工程が煩雑で、工業的製造方法としては不適である。また、マルトース・ホスホリラーゼ及びトレハロース・ホスホリラーゼを用いる方法は、いずれもグルコース-1リン酸を経由しており、その基質濃度を高めることができ難であり、また、両酵素の反応系が可逆反応で目的物の生成率が低く、更には、両酵素の反応系を安定に維持して反応をスムーズに進行させることが困難であって、未だ、工業的製造方法として実現するに至っていない。

【0004】 これに關係して、『月刊フードケミカル』、8月号、第67乃至72頁(1992年)、「澱粉利用開発の現状と課題」の「オリゴ糖」の項目において、「トレハロースについては著しく広い応用範囲が考えられるが、本糖の糖粉糖質からの脱接移動・加水分解反応を用いた酵素の生産は、現在のところ学術的には不可能であるといわれている。」と記載されているよう

3

に、澱粉を原料とし、酵素反応によってトレハロースを製造することは、従来、学術的にも不可能であると考えられてきた。

【0005】一方、澱粉を原料として製造される澱粉部分分解物、例えば、澱粉液化物、各種デキストリン、各種マルトオリゴ糖などは、通常、その分子の末端に還元基を有し還元性を有することが知られている。このような澱粉部分分解物を、本明細書では、還元性澱粉部分分解物と称する。一般に、還元性澱粉部分分解物は、固体物当たりの還元力の大きさをデキストロース・エクイバレンント (Dextrose Equivalent, D E) として表している。この値の大きいものは、通常、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起こしやすく、褐変し、悪臭を発生して、品質を劣化しやすい性質のあることが知られている。

【0006】このような還元性澱粉部分分解物の種々の特性は、D E の大小に依存しており、還元性澱粉部分分解物と D Eとの関係は極めて重要である。従来、当業界では、この関係を断ち切ることは不可能とさえ信じられてきた。

【0007】還元性澱粉部分分解物と D Eとの関係を断ち切る唯一の方法は、還元性澱粉部分分解物を高压水素添加法などによって、その還元基を糖アルコールに変換して還元性糖質にする方法である。しかし、この方法は、高压オートクレーブを必要とし、多量の水蒸やエネルギーを消費するのみならず、防災上からも高度な安全施設や管理を必要としている。その上、得られる還元性澱粉部分分解物の糖アルコールは、原料の還元性澱粉部分分解物がグルコースのみからなるのにに対し、グルコースとソルビトールとから構成される点で異なり、それを摂取することによって、一過性ではあるが、難消化、緩下の症状を起す懸念もある。従って、還元性澱粉部分分解物の構成糖であるグルコースを変えることなく、その還元力を低減若しくは消滅させる方法の確立が望まれる。

【0008】これを解決するために、本発明者等は、先に、特願平6-144092号明細書で、マルトースをトレハロースに変換する新規マルトース・トレハロース変換酵素(本酵素を、本明細書を通じて、マルトース・トレハロース変換酵素と称する。)を開示し、本マルトース・トレハロース変換酵素を利用して、マルトースからトレハロースとこれを含む糖質の製造方法を確立した。

【0009】しかしながら、微生物を培養して該酵素を产生せしめる培養時間に加えて、酵素回収の時間、マルトースからのトレハロースへの酵素反応時間を必要とし、工業的に実施する上でかなりの長時間を要する欠点のあることが判明した。マルトースからトレハロースを生産するに際し、該酵素の生産をも含めて、より簡便

に、容易に実施しうるトレハロースの製造方法の確立が望まれる。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、マルトースからのトレハロースを、簡便に、短時間に製造しうる新規方法を確立し、併せて、その用途を提供するものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、前記課題を解決するために、マルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物の培養状況と該酵素の産生状況について鋭意研究を続けてきた。その結果、該微生物は、マルトース・トレハロース変換酵素をかなり早期から産生していることを見出すとともに、培養中の栄養培地に、マルトースを共存せしめることにより、容易にトレハロースを生成、蓄積することを見出し、本発明を完成了。

【0012】すなわち、本発明は、マルトースを含有せしめた栄養培地に、マルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物を培養し、得られるトレハロース、又は、これを含む糖質、及び該糖質の製造方法、並びに、該糖質を含有せしめた組成物を確立するものである。本発明において、マルトースとしては、とりわけ、澱粉を液化したものが β -アミラーゼ又は β -アミラーゼとともに澱粉枝条酵素を、作用させて得られるものが好適であり、また、微生物としては、とりわけ、マルトース・トレハロース変換酵素産生能を有している微生物の利用が、トレハロース生産にとって極めて有利である。このようにして得られるトレハロースやこれを含む糖質は、安定性が高く、取り扱いが容易で、広範な用途に利用でき、例えば、飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0013】本発明で用いるマルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物としては、マルトースをトレハロースに変換する酵素を産生する微生物であればよく、例えば、特願平6-144092号明細書に開示されるビメロバクター属、ショードモナス属及びサーマス属に属する微生物が好適である。

【0014】微生物の培養に用いる培地は、微生物が生育でき、マルトース・トレハロース変換酵素を産生しうる栄養培地であって、トレハロース生産のための基質となるマルトースを含有するものが採用される。必要に応じて、微生物が資化しうる他の炭素源、例えば、グルコース、フラクトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜などの糖質、又には、ケエン酸、コハク酸などの有機酸、又は、その塩を併用することも随意である。培地に含有せしめるマルトースの濃度は、20w/v%以下、望ましくは15w/v%以下、更に望ましくは5乃至10w/v%付近が好適である。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩

などの無機素化合物や、例えば、尿素、コーン・ステイプル・リカ、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機素含有物が適宜用いられる。また、無機成分としては、例えは、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが適宜用いられる。更に、必要に応じて、アミノ酸、ビタミンなどを組み合わせられる。

【0015】培養条件は、微生物が生育し、マルトース・トレハロース変換酵素を產生すればよく、通常、温度4乃至8℃、留ましくは20乃至75℃、pH5乃至9、留ましくは6乃至8、5から選ばれる条件で好気的に行われる。培養時間は微生物が増殖する以上の時間であればよく、留ましくは10乃至100時間である。また、培養液の溶存酸素濃度に特に制限はないが、通常は、0.5乃至20 ppmが好ましい。そのために、通気孔を調節したり、搅拌したり、通気に液体を追加したり、また、ファーメンター内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養、連続培養又は半連続培養のいずれでもよい。

【0016】このようにして、マルトースを含有せしめた栄養培地に、マルトース・トレハロース交換酵素並能を有する微生物を培養して、培養物中にトレハロースを生成、蓄積せしめることができる。また、必要なならば、別に調製したマルトース・トレハロース交換酵素を、培養中の栄養培地に補足して、トレハロースの生成速度を高めることも、また、アニオン界面活性剤、非イオン界表面活性剤などの界面活性剤及び／又は卵白リゾチームなどの溶菌酵素を培養中の栄養培地に加えてトレハロースの生成速度を高めることも有利に実施できる。このようにして、生成、蓄積されたトレハロースは、培養液中の不溶物を分離し、得られる液体部分に含まれる。

【0017】トレハロースを含有する培養物は、まず、公知の固液分離法、例えは、濾過又は遠心分離などにより、除菌液とし、これを常法に従つて、濃縮し、活性化で脱色、H型、O型イオン交換樹脂で脱塩して精製し、濃縮し、シラップ状製品とする。更に乾燥して粉末状製品にすることも随意である。必要ならば、培養物そのまま平皿又は中性系剤などの膜滤過器かけ、菌体などの不溶物とともに溶性の蛋白質、核酸などの高分子物を除去するか、又は、予め、遠心分離などにより不溶物を除去し、次いで、膜滤過により溶性高分子物を除去した後、常法に従つて、濃縮、脱色、脱塩して精製し、トレハロース、又は、これを含む糖質製品を有利に製造することができる。

【0018】次に、本発明のトレハロース生成に寄与しているマルトース・トレハロース変換酵素について説明する。酵素活性は、^堆生産の菌体及び除菌液いずれにも認められ、菌体及び胞膜粗粒子を粗酵素液として採取することも、また、培養全液体を粗酵素液として用いることとも

できる。培養物から菌体を除去するには公知の固液分離法が採用される。例えば、培養物そのものをそのまま遠心分離する方法、あるいはブレコートフィルターなどを用いて濾過分離する方法、平膜、中空系膜などの膜濾過により分離する方法などが適宜採用される。除菌液をそのまま酵素液として用いることができるが、一般的には、濃縮して用いられる。濃縮方法としては、例えば、硫酸安息香法、アセトセル及びアルカルリ脱脂法、平膜、中空系膜など濃縮操作が採用される。

10 【0019】更に、除菌液及びその濃縮物を公知の方法により固定化することもできる。例えば、イオン交換体への結合法、樹脂及び膜などの共有結合・吸着法、高分子物質を用いた包涵法などを採用される。また、培養物から分離した菌体もそのまま粗酵素液として用いることができるが、これを固定化して用いてもよい。一例として、これをアルギン酸ナトリウムと混合して、塩化カルシウム溶液中に滴下して粒状にゲル化させて固定化する。この粒状化物をさらにボリエチレンimin、グルタルアルデヒドで処理して固定化してもよい。菌体から
20 酵素を抽出して、その抽出液を粗酵素液として用いることができる。例えば、超音波による破碎法、ガラスビーズ及びアルミニウムによる機械的破碎法、フレンチプレスによる破碎法などで菌体から酵素を抽出し、過心分離又は膜過濾などで清澄な粗酵素液を得ることができる。

【0020】本酵素液はそのまま用いることができるが、公知の方法によって更に精製して利用することができる。一例として、培養液の処理物を硫安塩析して濃縮した粗酵素液品を透析後、東ソー株式会社製『D.F.E.-トヨパール』などを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、統いて、同社製『ブチルトヨパール』などを用いた硫酸カラムクロマトグラフィー、同社製『トヨパール HW-55』などを用いたゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製することにより、電気泳動的に単一な酵素を得ることができる。

(1) 作用

マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。

(三) 俗語

(2) 分子量
S D S-ゲル電気泳動法で、約 57,000 乃至 12

10,000ダル

(3) 寄電点
アンフォライン含有電気泳動法により、pI約3.8乃至

三五、一。

(4) 活性阻害
1 mM Cu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50 mM トリス塩酸緩衝液で

4書を受ける。

微生物により產生された酵素である。

【0022】由來微生物の違いによる具体例を示せば次の通りである。

【ビメロバクター・スピーシーズ R48由來のマルトース・トレハロース変換酵素】

(1) 作用

マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。1モルのマルトース又はトレハロースからそれぞれ約1モルのトレハロース又はマルトースを生成する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法で、約57,000乃至67,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法で、pI約4.1乃至5.1。

(4) 活性阻害

1mM Cu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50mMトリス塩酸緩衝液で阻害を受ける。

(5) 至適温度

pH 7.0、60分間反応で、20℃付近。

(6) 至適pH

25℃、60分間反応で、pH約7.0乃至8.0。

(7) 温度安定性

pH 7.0、60分間保持で、30℃付近まで安定。

(8) pH安定性

20℃、60分間保持で、pH約6.0乃至9.0。

【0023】

【ショードモナス・ブチダ H262由來のマルトース・トレハロース変換酵素】

(1) 作用

マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。1モルのマルトース又はトレハロースからそれぞれ約1モルのトレハロース又はマルトースを生成する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法で、約110,000乃至120,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法で、pI約4.1乃至5.1。

(4) 活性阻害

1mM Cu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50mMトリス塩酸緩衝液で阻害を受ける。

(5) 至適温度

pH 7.0、60分間反応で、37℃付近。

(6) 至適pH

35℃、60分間反応で、pH約7.3乃至8.3。

(7) 温度安定性

pH 7.0、60分間保持で、40℃付近まで安定。

(8) pH安定性

35℃、60分間保持で、pH約6.0乃至9.5。

【0024】

【サーマス・アクアティカス ATCC33923由來のマルトース・トレハロース変換酵素】

(1) 作用

マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。1モルのマルトース又はトレハロースからそれぞれ約1モルのトレハロース又はマルトースを生成する。

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法で、約100,000乃至110,000ダルトン。

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法で、pI約3.8乃至4.8。

(4) 活性阻害

1mM Cu⁺⁺、Hg⁺⁺又は50mMトリス塩酸緩衝液で阻害を受ける。

(5) 至適温度

pH 7.0、60分間反応で、65℃付近。

(6) 至適pH

60℃、60分間反応で、pH約6.0乃至6.7。

(7) 温度安定性

pH 7.0、60分間保持で、80℃付近まで安定。

(8) pH安定性

60℃、60分間保持で、pH約5.5乃至9.5。

【0025】マルトース・トレハロース変換酵素の活性は、次のようにして測定する。基質としてマルトース2

30 0w/v% (1.0mMリソ酸塩緩衝液、pH7.0) 1mLに酵素液1mLを加え、反応温度を25℃、35℃あるいは60℃とし、60分間反応させた後、1.000で10分間加熱して反応を停止させる。この反応液を正確に5.0mMリソ酸塩緩衝液pH7.0で5倍11倍に希釈し、その希釈液0.4mLにトレハラーゼ含有溶液(1単位/mL)を0.1mL添加したものを45℃、120分間インキュベートした後、この反応液中のグルコース量をグルコースオキシダーゼ法で定量する。対照として、すなわち0.00℃で10分間加熱することにより失活させた酵素液及びトレハラーゼを用いて同様に測定する。

上記の測定方法を用いて、増加するグルコース量からマルトース・トレハロース変換酵素により生成するトレハロース量を求め、その活性1単位は、1分間に1μmol/Lのトレハロースを生成する酵素量と定義する。

【0026】なお、反応温度は、マルトース・トレハロース変換酵素が、ビメロバクター属に属する微生物由來の場合に25℃とし、ショードモナス属に属する微生物由來の場合に35℃とし、サーマス属に属する微生物由來の場合に60℃とした。

40 【0027】次に、本発明で使用される澱粉は、どうも

ろこし澱粉、米澱粉、小麦澱粉などの地上澱粉であっても、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、タピオカ澱粉などの地下澱粉であってもよい。澱粉を液化するには、通常、澱粉を水に懸濁した澱粉乳、望ましくは濃度10%以上、更に望ましくは約20乃至50%とし、これを加熱して機械的に液化しても、酸又は酵素で液化してもよい。液化の程度は、比較的低いものが適しており、望ましくはD.E.15未満、更に望ましくはD.E.10未満のものが好適である。酸で液化する場合には、例えば、塗酸、磷酸、硫酸などで液化し、その後、炭酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸ナトリウムなどで必要pHに中和して利用すればよい。酵素で液化する場合には、 α -アミラーゼ、とりわけ、耐熱性の液化型 α -アミラーゼの使用が適している。

【0028】本発明で澱粉液化溶液からマルトースを產生するために用いる β -アミラーゼは、公知方法により、甘藷、大麦、小麥などの植物、バチス科に属する微生物の培養物などから調製してもよく、また、市販の酵素剤を利用することも随意である。また、本発明で用いる澱粉枝切酵素は、澱粉を比較的低D.E.に液化したもの、望ましくは、D.E.15未満の液化溶液に作用し、澱粉の枝分かれ結合を加水分解する酵素であって、公知のブルラーゼ、イソアミラーゼなどが有利に利用でき、また、市販の酵素剤を利用することも有利に実施できる。

【0029】酵素の使用量は、作用条件、反応時間によって適宜選べばよいが、通常、基質である澱粉液化溶液に対して、圓形ゴムラム当たり、 β -アミラーゼの場合、約1乃至100単位から選ばれ、澱粉枝切酵素の場合、約1乃至2,000単位から選ばれる。

【0030】このようにして得られるマルトースは、本発明の培養方法によるトレハロース、又は、これを含む糖質製造用の糖源として有利に利用できる。また、市販のマルトースを利用することも有利に実施できる。マルトースを栄養培地に含有せしめる時期は、トレハロースが生成できる時期であればよく、培養初期から含有せしめておくことも、培養途中から含有せしめることも随意である。また、連続又は半連続培養する場合には、例えは、トレハロースを生成せしめた培養培地の一部を抜き出し、これと同容量のマルトースを含有せしめた栄養培地を追加して培養すればよい。また、培養を、澱粉液化溶液に β -アミラーゼ又は β -アミラーゼとともに澱粉枝切酵素を共存せしめた栄養培地で行うことも随意である。

【0031】このようにして得られるトレハロースを含む培養物は、常法により、濾過、遠心分離などして菌体などの不溶物を除去した後、濃縮、活性炭で脱色、H型、OII型イオン交換樹脂で脱塩して精製し、濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。必要ならば、更に、精製、例え

ば、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコール及びアセトンなど有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離、更には、酵母での発酵処理、アルカリ処理などによる残存している還元性糖質の分解除去などの方法を1種又は2種以上組合わせて精製することにより、最高純度のトレハロース製品を得ることも容易である。

10 【0032】とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーの採用が好適であり、例えは、特開昭58-23799号公報、特開昭58-72598号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雜糖類を除去し、目的のトレハロース含量を向上させた低還元性糖質を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

20 【0033】このようにして得られた本発明のトレハロースを含む糖質を、必要により、グルコアミラーゼ又は α -グルコンダーゼで分解し、甘味性、還元力などを調整したり、粘性を低下させたりすることも、また、水素添加して残存する還元性糖質を糖アルコールにして還元力を消滅せしめることなどの更なる加工処理を施すことも随意である。

【0034】とりわけ、本発明のトレハロースを含む糖質に対して、グルコアミラーゼ又は α -グルコンダーゼを作用させてトレハロースとグルコースとの混合溶液とし、これを、前述の精製方法、例えは、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどにより、グルコースを除去すれば、トレハロース高含有部分を採取することができる。これを精製、濃縮して、シラップ状製品を得ることも、更に濃縮して過飽和にし、晶出させてトレハロース含水結晶又は無水結晶トレハロースを得ることも有利に実施できる。

40 【0035】トレハロース含水結晶を製造するには、例えは、純度約60%以上、濃度約6.5乃至9.0%のトレハロース高含有液を助晶由にとり、必要に応じて、0.1乃至2.0%の晶種共存下で、温度9.5℃以下、望ましくは1.0乃至9.0℃の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、トレハロース含水結晶を含有するマスクットを製造する。また、減圧濃縮しながら析出させる逆結晶析法を採用することも有利に実施できる。マスクットからトレハロース含水結晶又はこれを含有する含蜜結晶を製造する方法は、例えは、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流动造粒方法、噴霧乾燥法など公知の方法を採用すればよい。

【0036】分蜜方法の場合には、通常、マスクットをバケット等遠心分離機にかけ、トレハロース含水結晶と蜜(母液)とを分離し、必要により、該結晶に少量の50 冷水をスプレーして洗浄することも容易な方法であり、

より高純度のトレハロース含水結晶を製造するのに好適である。噴霧乾燥方法の場合には、通常、濃度7.0乃至8.5%、晶出率2.0乃至6.0%程度のマスキットを高圧ポンプでノズルから噴霧し、結晶粉末が溶解しない温度、例えば、6.0乃至100℃の熱風で乾燥し、次いで3.0乃至6.0℃の温風で約1乃至20時間熟成すれば非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。また、ブロック粉碎方法の場合には、逆流、水分1.0乃至2.0%、晶出率1.0乃至6.0%程度のマスキットを約0.1乃至3日間置して全体をブロック状に晶出固化させ、これを粉碎又は切削などの方法によって粉末化し乾燥すれば、非吸湿性又は難吸湿性の含蜜結晶が容易に製造できる。

【0037】また、無水結晶トレハロースを製造するには、トレハロース含水結晶を乾燥して変換させることもできるが、一般的には、水分10%未満の高濃度トレハロース高含有溶液を助晶剤にとり、稀溶液下で5.0乃至16.0℃、望ましくは8.0乃至14.0℃の範囲で攪拌しつつ無水結晶トレハロースを含有するマスキットを製造し、これを比較的斯温乾燥条件下で、例えば、ブロック粉碎、流動造粒、噴霧乾燥などの方法で晶出、粉末化して製造される。

【0038】このようにして製造される本発明のトレハロース、又はこれを含む糖質は、還元性が低く安定であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、虫白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、転変することも、異臭を発生することもなく、混合した他の素材を損なうこともない。また、還元力が低いにもかかわらず低粘度であり、良質で上品な甘味を有している。

【0039】史に、本発明のトレハロースはトレハラーゼにより容易にグルコースにまで分解することから、経口摂取により、消化吸収され、カロリーランとして利用される。虫歯誘発などによって、酸酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても利用できる。また、漫透圧調節性、賦形性、黒り付与性、保湿性、粘性、他の糖の晶出防止性、難溶性、糊化緩和の老化防止性などの性質を具備している。

【0040】また、本発明のトレハロースは、経管栄養剤、輸液剤などとして非経口的に使用され、毒性、副作用の懸念もなく、よく代謝、利用され、生体へのエネルギー補給に有利に利用することができる。また、安定な甘味料であることにより、トレハロース含水結晶の場合には、ブルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤の糖衣剤としても利用することも有利に実施できる。

【0041】また、無水結晶トレハロースの場合には、食品、医薬品、化粧品、その原材料、又は加工中間物などの含蜜結晶の脱水剤としても有利に利用でき、安定で高品質の粉末、顆粒、錠剤など固形状物を容易に製造するこ

とができる。

【0042】従って、本発明のトレハロース、又はこれを含む糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤、脱水剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、飼料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0043】本発明のトレハロース、又は、これを含む糖質は、そのまま味付けのための調味料として使用することができる。必要なならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、マルトース、蔗糖、異性化糖、蜂蜜、メープルシュガー、インマルトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、フランクトオリゴ糖、ラクトスクロース、ソルビトール、マルチトール、ラグチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、アーティコシルステビオシド、レバディオシド、グリセリルチノン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエスチル、サッカリン、グリシン、アラニンなどのような他の甘味料の1種又は2種以上の適量と混和して使用してもよく、また必要なならば、デキストリン、澱粉、乳糖などのような增量剤と混和して使用することもできる。

【0044】また、本発明のトレハロース、又は、これを含む糖質の粉末乃至結晶状製品は、そのまで、又は必要に応じて、增量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成型して使用することも随意である。

【0045】また、本発明のトレハロース、又は、これを含む糖質の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の甘味を行なう各種物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般的の飲食物の甘味付け、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。

【0046】例えば、アミノ酸、ペプチド類、昆蟲、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼肉のタレ、カレールウ、シチューソース、スープの素、ダシの素、核酸系調味料、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなど各種調味料として有利に使用できる。

【0047】また、例えば、せんべい、あられ、おこし、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、ショートクリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドナツ、チョコレート、チーズケーキ、キャラメル、キャラメルなどの洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷室などのシロップ類、フラワーベースト、ビーナツベースト、フルーツベースト、スプレッドなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、

べつたら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素類、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、かまぼこ、ちくわ、天ぷらなどの魚肉製品、ウニ、イカの塩辛、酢こんぶ、さきするめ、ふぐみりん干しなどの各種珍味類、のり、山菜、するめ、小魚、貝などで製造されるつぐだ煮鰯、煮豆、ボテトサラダ、こんぶ巻などの惣菜食品、ヨーグルト、チーズなどの乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜のピューラー、缶詰類、清酒、合成酒、リキュール、洋酒などの酒類、コーヒー、紅茶、コカ・コーラ、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席しるこ、即席スープなどの即席食、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品、乾燥食品などの各種飲食物への甘味付けに、星味改良に、また、品質改良などに有利に利用できる。

【0048】また、家畜、家禽、その他蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のために飼料、飼料などの嗜好性向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練磨磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口巾清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種衛生形、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、又は星味改良剤、嗜好剤として、さらには品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。

【0049】品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失い易い各種生理活性物質又はこれを含む健康新品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、ツモア・ネクロシス・ファクター- α 、ツモア・ネクロシス・ファクター- β 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスクアーファクター、インターリキン-1などのリンゴカイン、インシクリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ毒毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤、ベニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、スプレートマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カルボニド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン、リバーゼ、エラスターーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 β -アミラーゼ、ソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素、葉用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌、ローヤルゼリーなどの各種生理活性物質を、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状又は固状の健康食品や医薬品などに容易

に製造できることとなる。

【0050】以上述べたような各種組成物にトレハロース、又は、これを含む糖質を含有せしめる方法は、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、空気、被覆、噴霧、注入、晶出、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常0.1%以上、望ましくは1%以上に含有せしめるのが好適である。次に実験により本発明をさらに具体的に説明する。

【0051】まず、新規微生物ビメロバクター・スピニーズ R 4-8、ショードノマス・ブチダ H 2-6-2 及びサーマス・アクアティカス ATCC 33923からのマルトース・トレハロース変換酵素について説明し、次いで、他の公知微生物からのマルトース・トレハロース変換酵素について説明する。

【0052】

【実験1 酵素の生産】グルコース2.0w/v%、ボリベントン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、リナン酸二カリウム0.1w/v%、リナン酸ナトリウム0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.5w/v%、炭酸カルシウム0.5w/v%、及び水からなる液体培地を、500m1容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで115℃、30分間滅菌し、冷却して、ビメロバクター・スピニーズ R 4-8 (FERM BP-4315) を接種し、27℃、200rpmで24時間回転振盪培養したものを種培養とした。

【0053】容量30lのファーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約20l入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1v/v%を接種し、温度27℃、pH 6.0乃至8.0に保ちつつ、約40時間通気搅拌培養した。

【0054】培養液のマルトース・トレハロース変換酵素活性は、0.55単位/m1であった。培養液の一部を取り、遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を50mMリソ酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁し、元の培養液と同じ液量とした後、菌体懸濁液と培養液上清のマルトース・トレハロース変換酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、0.05単位/m1の活性が、培養液上清には、0.05単位/m1の活性が認められた。なお、本酵素の活性は、反応温度を25℃にして測定した。

【0055】

【実験2 酵素の精製】実験1で得た培養液を遠心分離して菌体重約0.5kgの菌体を回収し、これを10mMリソ酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁した。この菌体懸濁液約5lをエドモンドビューラー社製「ヴィブローゲン セルミル」にかけ、菌体を破碎し、この破碎処理液を遠心分離(15,000G、30分間)することにより、約4.5lの上清を得た。その上清液に飽和度0.

15 3 になるように硫酸を加え溶解させ、4℃、4時間放置

した後、遠心分離することにより上清を回収した。

【0056】更に、その液に飽和度0.8になるように硫酸を加え溶解させ、4℃、4時間放置した後、遠心分離することにより硫酸塩析物を回収した。

【0057】得られた硫酸塩析物を1.0 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離して不溶物を除いた。その透析液(4.00 ml)を2回に分けて、「DEA-Eトヨパール」を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量3.00 ml)を行った。

【0058】本発明のマルトース・トレハロース変換酵素は「DEA-Eトヨパール」に吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから溶出した。溶出した酵素活性測定を*

16 *回収した後、1M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、

その透析液を遠心分離して不溶物を除き、次に、東ソー株式会社製『ブチルトヨパール 650』を用いた森水カラムクロマトグラフィー(ゲル量3.00 ml)を行った。吸着したマルトース・トレハロース変換酵素を硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントによりカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。

【0059】統いて、ファルマシア・エルケイビー社製『モノQ HR5/5』を用いたイオン交換クロマトグラフィー(ゲル量1.0 ml)を行い、溶出した酵素活性画分を回収した。精製の各ステップにおける酵素活性量、比活性、収率を表1に示す。

【表1】

工程	酵素活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
破碎後の上清液	7310	0.13	100
硫酸分離後の透析液	2730	0.16	37.3
イオン交換カラム透出液	2290	0.58	31.3
森水カラム透出液	1180	5.4	15.9
イオン交換カラム透出液	819	16.8	11.2

【0061】精製した酵素標品を7.5w/v%濃度ボリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したこと、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

【0062】

【実験3 酵素の性質】実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度1.0w/v%)に供し、同時に泳動した分子量マーク(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したこと、分子量約57,000乃至67,000ダルトンであった。

【0063】精製マルトース・トレハロース変換酵素標品を2w/v%アンフォライン(ファルマシア・エルケイビー社製)含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約4.1乃至5.1であった。

【0064】本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図1(温度の影響)、図2(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH 7.0、6.0 分間反応で20℃付近、至適pHは、2.5℃、6.0 分間反応で約7.0乃至8.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(5.0 mMリン酸緩衝液、pH 7.0)を各温度で6.0 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの5.0 mM緩

30 衡液中で20℃、60分間保持した後、pHを7.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図3(温度安定性)、図4(pH安定性)に示した。本酵素の温度安定性は30℃付近まであり、pH安定性は約6.0乃至9.0であった。なお、本酵素活性は、1 mM Cu²⁺、Hg²⁺又は5.0 mMトリス塩酸緩衝液で阻害された。

【0065】

【実験4 各種糖質への作用】各種糖質を用いて、基質になりうるかどうかの試験をした。グルコース、マルトース、マルトオリース、マルトテトラオース、マルトペニタオース、マルトヘキサオース、マルトヘptaオース、可溶性糊粉、アミロース(平均重合度18)、トレハロース、ネオトレハロース、ゲンチオビオース、コージビオース、イソマルトース、セロビオース、マルチテール、シクロロース、マルツロース、ツラノース、パラチノース、トレハロロース、あるいはラクトースの溶液、更に、α-グルコース・1-リン酸と等量のグルコース、又は、β-グルコース・1-リン酸と等量のグルコースとを含む溶液を調製した。

【0066】これらの溶液に、実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素を作用形態グラム当たりそれぞれ2単位ずつ加え、基質濃度を5w/v%になるよう調整し、これを20℃、pH 7.0で24時間作用させた。酵素反応前後の反応液をメルク社製『キーゼルゲル60』(アルミプレート、20×20 cm)を用いた薄層クロマトグラフィー(以下、TLCと略称

する。)にかけ、それぞれの糖質に対する酵素作用の有無を確認した。TLCは展開溶媒に1-ブタノール:ビリジン:水=6:4:1(容積比)を用い、室温で1回展開した。発色は20%硫酸-メタノール溶液を噴霧 ふ

*し、110°Cで10分間加熱しておこなった。結果を表2に示す。

【0067】

【表2】

基質	酵素作用	基質	酵素作用
グルコース	-	セロビオース	-
マルトース	++	マルチトール	-
マルトトリオース	-	シュクロース	-
マルトテトラオース	-	マルツロース	-
マルトペンタオース	-	ツラノース	-
マルトヘキサオース	-	バラチノース	-
マルトヘptaオース	-	トレハロース	-
可溶性澱粉	-	ラクトース	-
アミロース	-	α -グルコース・1-リン酸	-
(平均重合度18)		+グルコース	
トレハロース	+	β -グルコース・1-リン酸	-
ネオトレハロース	-	+グルコース	
ゲンチオビオース	-		
コージビオース	-		
イソマルトース	-		

注) 酵素反応前後で、

-は、変化無しを示し、

+は、基質のスポットが僅かに減少し、他の生成物がみとめられるを示し、

++は、基質のスポットがかなり減少し、他の生成物がみとめられるを示す。

【0068】表2の結果から明かなように、本発明の酵素は、試験した多種の糖質のうち、マルトースとトレハロースのみに作用し、その他の糖質、とりわけ、 α -グルコース・1-リン酸とグルコースとを含む系や、 β -グルコース・1-リン酸とグルコースとを含む系に作用しないことから、従来知られているマルトース・ホスホリラーゼやトレハロース・ホスホリラーゼなどのホスホリラーゼとは違い、新規な酵素であることが判明した。

【0069】

【実験5】マルトース又はトレハロースからの生成物 最終濃度5%のマルトース水溶液に実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素を基質固形物グラム当たり2単位加え、20°C、pH 7.0で24時間作用させた。酵素反応液の糖組成は、ガスクロマトグラ

フィー(以下、GLCと略称する。)で分析した。酵素反応液の一部を乾固し、ビリジンに溶解した後トリメチルシリル化したものを分析試料とした。ガスクロマトグラフ装置は株式会社島津製作所製『GC-16A』、カラムはジー・エル・サイエンス株式会社製『2%シリコン OV-17/クロモソルブW』を充填したステンレスカラム(3mmΦ×2m)、キャリアーガスは窒素ガスを流量40ml/分で、カラムオーブン温度は160°Cから320°Cまで7.5°C/分の升温速度で分析した。検出は水素炎イオン検出器を用いた。その結果を表3に示す。

【0070】

【表3】

19

20

反応物中の糖	G L C 保持時間(分)	糖組成(%)
グルコース	3. 87および 4. 70	4. 9
マルトース	11. 93および 12. 27	22. 3
X	12. 34*	72. 8

注) *は、トレハロースの保持時間と一致する。

【0071】表3の結果から明かのように、反応生成物Xが多量に生成し、その保持時間が市販トレハロースのそれと一致していることが判明した。反応生成物Xを同定するために次の確認試験を行った。すなわち、前述のマルトースを基質とした酵素反応液を糖濃度2%になるよう2.0 mMリソマレート緩衝液、pH 4. 5で希釈し、この0. 5mIにグルコアミラーゼ(生化学工業株式会社製)0. 1単位を加え40°Cで2時間反応させた。

【0072】また、同様に酵素反応液を糖濃度2%になるよう2.0 mMリソマレート緩衝液、pH 7. 0で希釈し、この0. 5mIにトレハラーゼ0. 5単位を加え40°Cで2時間反応させた。マルトースを基質とした酵素反応液、そのグルコアミラーゼ処理液及びトレハラーゼ処理液をG L Cで分析、比較したところ、グルコアミラーゼ処理によりマルトースは完全にグルコースに分解され、*

*反応生成物Xは分解されずに残存していた。

【0073】一方、トレハラーゼ処理によりマルトースは残存していたが、反応生成物Xは完全にグルコースに分解された。グルコアミラーゼ及びトレハラーゼの反応特性を考慮すると、本発明の新規酵素によって生成するマルトースからのオリゴ糖はトレハロースであると判断される。

【0074】更に、トレハロースを基質として、マルトースの場合と同様の条件で精製酵素を作用させ、その反応液も同様にG L C分析したところ、本発明の酵素によってトレハロースからはマルトースが生成することが判明した。以上のG L C分析結果をまとめて表4に示す。

20 【0075】

【表4】

基質	反応物中の糖	本発明の酵素による反応物 糖組成(%)	グルコアミラーゼ処理後の 糖組成(%)	トレハラーゼ 処理後の糖組成(%)
マルトース	グルコース	4. 9	27. 9	78. 5
	マルトース	22. 3	0. 0	21. 5
	トレハロース	72. 8	72. 1	0. 0
トレハロース	グルコース	3. 2	19. 9	83. 3
	マルトース	17. 2	0. 0	16. 7
	トレハロース	79. 6	80. 1	0. 0

【0076】表4の結果から明かのように、本発明の酵素は、マルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換する。その平衡点は、トレハロース側に片寄っており、マルトースからのトレハロースへの変換率が高く、約70%以上になることが判明した。

【0077】

【実験6】トレハロース生成に及ぼすマルトース濃度の影響】マルトース濃度を2. 5%、5%、10%、20%あるいは40%で、温度20°C、pH 7. 0にて、実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルトースグラム当たり2単位加えて反応させ、経時に反応液を採取し、100°Cで10分間加熱して酵素を失活させた。

【0078】この反応液の全糖量をアンスロン硫酸法で、還元糖量をソモギー・ネルソン法でグルコース換算

で定量し、全糖量に対する還元糖量の割合を還元力として算出した。

【0079】また、この反応液を糖濃度約1%になるよう希釈し、少量限外透過程、日本ミリポアミリテッド製『モルカット I I - L G C』にて除蛋白を行い、高速液体クロマトグラフィー(以下、H P L Cと略称する。)40 にて糖組成を分析した。H P L Cの装置は東ソー株式会社製『C C P Dシステム』、分析カラムは株式会社ワイエムシイー製『YMC-p a c k P A - 0 3』(4. 6mm ϕ \times 250 mm)、溶離液はアセトニトリル:水 = 78 : 22(容積比)を流速1. 2 ml/minで、検出は示差屈折計で行った。それらの結果を表5に示す。

【0080】

【表5】

マルトース 濃度(%)	反応時間 (時間)	還元力 (%)	糖組成(%)		
			グルコース	マルトース	トレハロース
2.5	0	50.3	0.0	100.0	0.0
	2	36.7	1.3	68.8	29.9
	8	21.2	2.5	38.7	58.8
	23	12.3	3.8	17.2	79.0
5.0	48	14.5	5.9	17.1	77.0
	2	34.8	1.9	65.3	32.8
	8	20.2	2.6	35.7	61.7
	23	12.0	3.2	17.3	79.5
10.0	48	14.2	5.7	17.3	77.0
	2	32.2	1.3	63.0	35.7
	8	19.7	2.2	34.2	63.6
	23	12.5	3.6	17.5	78.9
20.0	48	14.0	6.1	17.4	78.5
	2	34.2	2.0	63.7	34.3
	8	20.2	2.9	35.1	62.0
	23	12.9	3.4	17.4	79.2
40.0	48	15.1	6.0	17.4	76.6
	2	34.8	1.6	68.2	30.2
	8	21.2	2.7	38.6	59.7
	23	12.8	3.7	17.7	78.6
	48	14.9	5.7	17.5	76.8

【0081】表5の結果から明かのように、基質のマルトース濃度に関係なく、マルトースからのトレハロースへの変換反応はよく進行し、トレハロースへ約80%変換した。

【0082】

【実験7 トレハロース生成に及ぼす温度の影響】マルトース濃度20%で、pH 7.0にして、実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルト*

*ースグラム当たり2単位加えて、温度5°C、10°C、15°C、20°Cあるいは25°Cで反応させ、経時に反応液を採取し、100°Cで10分間加熱して酵素を失活させた。この酵素反応液を火薙6と同様にして、HPLCにて糖組成を分析した。各温度、各時間でのトレハロース含量を表6に示す。

【0083】

【表6】

反応時間 (時間)	トレハロース含量(%)				
	5(°C)	10(°C)	15(°C)	20(°C)	25(°C)
2	26.1	28.0	32.9	34.6	34.7
8	49.5	54.3	61.2	62.0	61.1
23	78.2	79.5	80.9	79.2	78.7
48	81.8	80.9	80.4	78.8	72.7

【0084】表6の結果から明かのように、反応温度が高いほどトレハロース生成速度は大きくなる傾向にあつたが、温度5°Cでもマルトースからのトレハロースへの変換反応はよく進行し、トレハロースへ約82%変換した。

【0085】

【実験8 マルトースからのトレハロースの調製】マル

トース（株式会社林原生物化学研究所製）10重量部を水40重量部に溶解し、温度15°C、pH 7.0にて、実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルトースグラム当たり2単位加えて48時間反応させ、次いで100°Cで10分間加熱して酵素を失活させた。本溶液には、トレハロースを固形物当たり約7.4%含有していた。本溶液を活性炭で脱色し、イオン交

換樹脂(Η型及びΟΗ型)にて脱脂して精製し、濃度約7.8%に濃縮して、トレハロース含水結晶を種品として固形物当たり0.1%添加し、室温に一夜放置したところ、結晶が析出した。得られたマスクットを分離し、結晶に少量の水をスプレーして結晶を洗浄し、純度9.9、8%の極めて高純度のトレハロース含水結晶約3.0重畳を得た。

【0086】

【実験9 酵素の生産】グルコース2.0w/v%、硫酸アノミウム1.0w/v%、リン酸二カリウム0.1w/v%、リン酸ナトリウム0.06w/v%、硫酸マグネシウム0.05w/v%、炭酸カルシウム0.3w/v%、及び水からなる液体培地を、5000ml容三角フラスコに1.00mlずつ入れ、オートクレーブで115℃で、3分間滅菌し、冷却して、シュードモナス・ブチダ H262(FERM BP-4579)を接種し、27℃、200rpmで24時間振幅振とう培養したものを種培養とした。

【0087】容量30lのファーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約2l入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1v/v%を接種し、温度27℃、pH6.5乃至8.0に保ちつつ、約20時間通気搅拌培養した。

【0088】培養液のマルトース・トレハロース変換酵素活性は、0.12単位/mlであった。培養液の一部を探り、遠心分離して菌体と培養液上清とに分離し、更に菌体を5.0mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、元の培養液と同じ液量とした後、菌体懸濁液と培養液上清のマルトース・トレハロース変換酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には、0.11単位/mlの活性が、培養液上清には、0.01単位/mlの活性が認められた。なお、本酵素の活性は、反応温度を35℃にして測定した。

*【0089】

【実験10 酵素の精製】実験9で得た培養液を遠心分離して湿重量約0.45kgの菌体を回収し、これを1.0mMリノ酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した。この菌体懸濁液約2lを超高压菌体破碎装置(大日本製薬株式会社販売『ミニラボ』)で処理し、菌体を破碎し、この破碎液を遠心分離(15,000G、30分間)することにより、約1.7lの上清を得た。その上清液に飽和度0.7になるように硫酸を加え溶解させ、4℃、一夜放置した後、遠心分離することにより硫酸塩析物を回収した。

【0090】得られた硫酸塩析物を1.0mMリノ酸緩衝液(pH7.0)に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離して不溶物を除いた。その透析液(4.00ml)を2回に分けて、『DEAE-トヨバル』を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量3.00ml)を行った。

【0091】本発明のマルトース・トレハロース変換酵素は、『DEAE-トヨバル』に吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから溶出出した。溶出した酵素活性画分を回収した後、同緩衝液に対して透析し、再度、『DEAE-トヨバル』を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量8.0ml)を行った。吸着したマルトース・トレハロース変換酵素を食塩0.1Mから0.3Mのリニアグレジエントによりカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。

【0092】続いて、東ソーリ株式会社製造『トヨバルHW-55S』を用いたゲル過濾クロマトグラフィー(ゲル量4.00ml)を行い、溶出した酵素活性画分を回収した。精製の各ステップにおける酵素活性量、比活性、收率を表7に示す。

【0093】

【表7】

工程	酵素活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	收率 (%)
破碎後の上清液	1750	0.04	100
硫酸分離後の透析液	1200	0.07	68.5
第1回イオン交換 カラム溶出液	1090	0.53	62.3
第2回イオン交換 カラム溶出液	360	4.5	20.6
ゲル過濾カラム溶出液	150	8.5	8.9

【0094】精製した酵素標品を7.5w/v%濃度ボリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは單一で純度の高い標品であった。

【0095】

【実験11 酵素の性質】実験10の方法で得た精製マ

ルトース・トレハロース変換酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度7.5w/v%)に供し、同時に泳動した分子量マーク(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約110,000乃至120,000ダルトンであった。

25

【0096】精製マルトース・トレハロース変換酵素標品を2w/v%アンフォライン(ファルマシア・エルケイビー社製)含有等電点ポリアクリラミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約4.1乃至5.1であった。

【0097】本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図5(温度の影響)、図6(pHの影響)に示した。酵素の至適温度は、pH7.0、6.0分間反応で3.7℃付近、至適pHは、3.5℃、6.0分間反応で約7.3乃至8.3であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(5.0mMリン酸緩衝液、pH7.0)を各温度で60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pHの5.0mM緩衝液中で3.5℃、60分間保持した後、pHを7.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図7(温度安定性)、図8(pH安定性)に示した。本酵素の温度安定性は4.0℃付近まであり、pH安定性は約6.0乃至9.5であった。なお、本酵素活性は、1mM Cu⁺⁺、Hg⁺⁺又は5.0mMトリス塩基緩衝液で阻害された。

【0098】

* 【実験12 各種糖質への作用】反応温度を35℃とした以外は、実験4の方法に準じて、実験10で得たショードモナス・ブチダ H262の精製酵素を各種糖質に作用させて、基質になりうるかどうかの試験をした。その結果、ショードモナス・ブチダ H262の酵素は、ビメロバクター・スピーシーズ R48の酵素と同様、マルトースとトレハロースにのみ作用しマルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換した。その平衡点は、トレハロース側に片寄っており、マルトースからのトレハロースへの変換率が高く、約70%になることが判明した。

【0099】

【実験13 トレハロース生成に及ぼすマルトース濃度の影響】マルトース濃度を5%、10%、20%あるいは30%で、温度35℃、pH7.0にて、実験10の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルトースグラム当たり2単位加えて反応させ、経時に反応液を採取し、100℃で10分間加熱して酵素を失活させた。

【0100】この反応液を用いて、実験6と同様に還元力及び糖組成を測定した。それらの結果を表8に示す。

【0101】

【表8】

マルトース 濃度(%)	反応時間 (時間)	還元力 (%)	糖組成 (%)		
			グルコース	マルトース	トレハロース
5.0	0	50.3	0.0	100.0	0.0
	2	43.8	0.8	88.0	11.2
	7	35.0	0.5	72.7	26.8
	24	17.2	0.5	41.8	57.7
10.0	48	10.3	1.8	29.7	88.5
	2	46.8	1.2	86.5	12.3
	7	34.6	1.4	84.8	33.7
	24	16.0	2.2	38.4	61.4
20.0	48	14.8	3.7	26.5	89.8
	2	44.9	0.7	86.6	12.7
	7	32.7	1.2	86.6	32.2
	24	21.0	2.6	35.8	61.8
30.0	48	11.2	3.9	27.0	89.1
	2	44.8	0.0	89.5	10.5
	7	38.2	0.8	72.5	26.9
	24	17.8	1.8	41.8	56.4
	48	12.9	3.9	29.6	86.5

【0102】表8の結果から明らかなように、基質のマルトース濃度に関係なく、トレハロースを約70%生成した。

【0103】

【実験14 マルトースからのトレハロースの調製】マ 50 位加えて48時間反応させ、次いで100℃で10分間

ルトース(株式会社林原生物化学研究所販売)10重量部を水40重量部に溶解し、温度35℃、pH7.0にして、実験10の方法で得た本発明の精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルトースグラム当たり2単

27

加熱して酵素を失活させた。本溶液には、トレハロースを固形物当たり約6.9%含有していた。本溶液を活性炭で脱色し、イオン交換樹脂(H型及びOH型)にて脱塩して精製し、濃度約7.8%に濃縮して、トレハロース含水結晶を純品として固形物当たり0.1%添加し、空温に一夜放置したところ、結晶が析出した。得られたマスクットを分離し、結晶に少量の水をスプレーして結晶を洗浄し、純度9.9%、7%の極めて高純度のトレハロース結晶約2.3重量部を得た。

【0104】

【実験15 酵素の生産】ポリペプトン0.5w/v%、酵母エキス0.1w/v%、硝酸ナトリウム0.07w/v%、リン酸二ナトリウム0.01w/v%、硫酸マグネシウム0.02w/v%、堿化カルシウム0.01w/v%及び水からなる液体培地を、pH7.5に調整した後、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで120°Cで、20分間滅菌し、冷却して、サーマス・アクリティカス ATCC33923を接種し、60°C、pH6.5乃至8.0に保ちつつ、約20時間通気搅拌培養した。

【実験15】容量30lのファーメンター2基に種培養の場合と同様成る培地をそれぞれ約20l入れて、加熱滅菌、冷却して温度60°Cとした後、種培養液1v/v%を接種し、温度60°C、pH6.5乃至8.0に保ちつつ、約20時間通気搅拌培養した。

【実験16】培養液のマルトース・トレハロース変換酵素活性は0.35単位/mlであった。培養液の一部を探り、遠心分離して菌体と培養上清液に分離し、更に菌体を5.0mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸滴し、元の培養液と同じ液量とした後、菌体懸濁液と培養上清液のマルトース・トレハロース変換酵素活性を測定したところ、菌体懸濁液には0.33単位/mlの酵素活性が、また、培養上清液には0.02単位/mlの酵素活性が認められた。なお、本酵素の活性は、反応温度を60°Cにして測定した。

【0107】

【実験16 酵素の精製】実験15で得た培養液を遠心*

28

*分離して湿重量約0.28kgの菌体を回収し、これを1.0mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸滴した。この菌体懸濁液約1.91gを、超音波破碎機(株式会社日本精機製作所製『モデルUS3000』)で処理し、菌体を破碎した。この破碎処理液を遠心分離(15,000G、30分間)することにより、約1.81の上清を得た。その上清に飽和度0.7になるように硫酸を加え溶解させ、4°C、一夜放置した後、遠心分離機にかけ、硫酸塩析物を回収した。

【0108】得られた硫酸塩析物を1.0mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解させた後、同じ緩衝液に対して24時間透析し、遠心分離して不溶物を除いた。その透析液(1560ml)を、東ソー株式会社製『DEAE-トヨパール650』を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル量530ml)を3回に分けて行った。

【0109】本発明のマルトース・トレハロース変換酵素は『DEAE-トヨパール』に吸着し、食塩を含む同緩衝液でカラムから溶出した。溶出した酵素活性画分を回収した後、1M硫酸を含む同緩衝液に対して透析し、次に、『ブチルトヨパール650』を用いた疎水カラムクロマトグラフィー(ゲル量380ml)を行った。吸着したマルトース・トレハロース変換酵素を硫酸1Mから0Mのリニアグラジェントによりカラムより溶出させ、酵素活性画分を回収した。

【0110】次に、『トヨパールHW-55S』を用いたゲル通過クロマトグラフィー(ゲル量380ml)を行い、溶出した酵素活性画分を回収した。

【0111】統一、ファルマシア・エルケイビー社製『モノQ HR5/5』を用いたイオン交換クロマトグラフィー(ゲル量1.0ml)を行い、食塩0.1Mから0.35Mのリニアグラジェントにより溶出した酵素活性画分を回収した。精製の各ステップにおける酵素活性量、比活性、収率を表9に示す。

【0112】

【表9】

工程	酵素活性量 (単位)	比活性 (単位/mg蛋白)	収率 (%)
破碎後の上清液	8800	0.10	100
硫酸分画後の透析液	8710	0.16	99.0
イオン交換カラム溶出液	5690	2.5	64.7
疎水カラム溶出液	2050	17.6	23.3
ゲル通過カラム溶出液	937	113	10.6
イオン交換カラム溶出液	467	135	5.3

【0113】精製した酵素標品を5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品

であった。

【0114】

【実験17 酵素の性質】実験16の方法で得た精製マ

ルトース・トレハロース変換酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度 7.5 w/v %）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約 100,000 乃至 110,000 ダルトンであった。

【0115】精製マルトース・トレハロース変換酵素標品を 2% w/v アンフォライン（ファルマシア・エルケイビー社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルの pH を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点は pH 約 3.8 乃至 4.8 であった。

【0116】本酵素活性に及ぼす温度、pH の影響を活性測定方法に準じて調べた。結果を図 9（温度の影響）、図 10（pH の影響）に示した。酵素の至適温度は、pH 7.0、6.0 分間反応で 6.5 °C 付近、至適 pH は、6.0 °C、6.0 分間反応で約 6.0 乃至 6.7 であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（50 mM リン酸緩衝液を含む、pH 7.0）を各温度で 6.0 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH 安定性は、本酵素を各 pH の 50 mM 緩衝液中で 6.0 °C、6.0 分間保持した後、pH を 7.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図 11（温度安定性）、図 12（pH 安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約 8.0 °C 付近まであり、pH 安定性は約 5.5 乃至 9.5 であった。なお、本酵素活性は、1 mM C u⁺⁺、Hg²⁺

* 又は 50 mM トリス塩酸緩衝液で阻害された。

【0117】

【実験 18 各種糖質への作用】反応温度を 50 °C とした以外は、実験 4 の方法に準じて、実験 16 で得たサーマス・アクアティカス ATCC 33923 の精製酵素を各種糖質に作用させて、基質になりうるかどうかの試験をした。その結果、サーマス・アクアティカス ATCC 33923 の酵素はビメロバクター・スピシーズ R 48 の酵素、あるいは、ショードモナス・ブチダ H 10 262 の酵素と同様、マルトースとトレハロースにのみ作用しマルトースをトレハロースに変換し、トレハロースをマルトースに変換した。その平衡点は、トレハロース側に寄っており、マルトースからトレハロースへの変換率が高く、7.0% 以上になることが判明した。

【0118】

【実験 19 トレハロース生成に及ぼすマルトース濃度の影響】マルトース濃度を 2.5%、5%、10%、20% あるいは 40% で、温度 6.0 °C、pH 6.5 にて、実験 16 の方法で得たサーマス・アクアティカス ATCC 33923 の精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルトースグラム当たり 2.5 単位加えて反応させ、7.2 時間に反応液を採取し、100 °C で 30 分間加熱して酵素を失活させた。この反応液を用いて、実験 6 と同様に還元力及び糖組成を測定した。その結果を表 10 に示した。

【0119】

【表 10】

マルトース濃度 (%)	反応時間 (時間)	還元力 (%)	糖組成 (%)		
			グルコース	マルトース	トレハロース
0	50.4	0.0	100.0	0.0	0.0
2.5	72	16.3	4.5	25.2	70.3
5.0	72	15.9	4.4	25.8	70.0
10.0	72	16.0	4.7	25.6	69.7
20.0	72	16.6	4.4	28.2	69.4
40.0	72	16.8	5.0	28.4	68.6

【0120】表 10 の結果から明らかなように、基質のマルトース濃度に関係なく、トレハロースを約 70% 生成した。

【0121】

【実験 20 トレハロース生成に及ぼす温度の影響】マルトース濃度 20%、pH 6.5 にして、実験 16 の方法で得たサーマス・アクアティカス ATCC 33923 の精製マルトース・トレハロース変換酵素をマルト

ースグラム当たり 2.5 単位加えて、温度 4.0 °C、5.0 °C、6.0 °C、あるいは 7.0 °C で反応させ、経時に反応液を採取し、100 °C で 30 分間加熱して酵素を失活させた。この反応液を実験 6 と同様にして、HPLC にて糖組成を分析した。各温度、各時間でのトレハロース含量を表 11 に示す。

【0122】

【表 11】

反応時間 (時間)	トレハロース含量(%)			
	40(℃)	50(℃)	60(℃)	70(℃)
4	45.0	55.7	56.8	50.3
8	61.0	67.3	64.3	58.5
24	79.1	76.5	71.1	64.3
48	80.7	76.9	70.2	62.8
72	80.0	76.4	68.5	60.2

【0123】表11の結果から明らかなように、マルトースからのトレハロースへの変換率は反応温度が低いほど高く、40℃においてトレハロースへ約80%変換した。

【0124】

【実験21 他の微生物からのマルトース・トレハロース変換酵素の生産とその性質】公知微生物のうち、本発明のマルトース・トレハロース変換酵素生産能の確認さ

れた特定の微生物を、実験15の場合に準じて三角フラスコにて48時間培養した。培養液の酵素活性を調べた後、実験16の方法に準じて、培養液を破砕装置にかけ、その上清を透析して、部分精製酵素を得、実験17の方法に従って、その性質を調べた。結果を表12に示した。

【0125】

【表12】

微生物名	活性 (単位/mg)	至適温度	至適pH	pH安定性
サーマス・アクリティカス (<i>Thermus aquaticus</i>) ATCC 27054	0. 30	65°C付近	約6. 0乃至6. 5	80°C付近まで 約5. 5乃至9. 5
サーマス・ルーバー ⁵ (<i>Thermus ruber</i>) ATCC 33948	0. 26	50°C付近	約6. 0乃至7. 0	50°C付近まで 約5. 5乃至10. 0
サーマス・スピニーア (<i>Thermus sp.</i>) ATCC 43815	0. 25	65°C付近	約6. 0乃至6. 5	80°C付近まで 約5. 5乃至9. 5
ビメロバクター・スピニーシ 実験1乃至3記載の 一ズ R 4.8	0. 55	20°C付近	約7. 0乃至8. 0	30°C付近まで 約8. 0乃至9. 0
ビメロバクター・スピニーシ 実験1.2乃至1.4記載の ショードモナス・チャダ H 2.6.2	0. 12	37°C付近	約7. 3乃至8. 3	40°C付近まで 約6. 0乃至9. 5
実験1.8乃至2.0記載の サーマス・アクリティカス ATCC 33923	0. 35	65°C付近	約6. 0乃至6. 7	80°C付近まで 約5. 5乃至9. 5

【0126】表12に示すこれらサーマス属に属する公知微生物由来の部分精製酵素を用いて、実験1.8の方法に従って、各種酵質への作用を調べたところ、サーマス・アクリティカス ATCC 33948由來の酵素の場合と同様に、マルトースとトレハロースにのみ作用し、マルトースからトレハロースを生成することが判明した。

【0127】また、サーマス・ルーバー ATCC 35948のマルトース・トレハロース変換酵素は、サーマス・アクリティカス ATCC 33923の酵素に比し、その至適温度、安定温度は低かったが、他のサーマス属の酵素は、サーマス・アクリティカス ATCC 33923の酵素とほぼ同じ性質を示し、耐熱性の高いことが判明した。

【0128】

【実験2.2 調製したトレハロースの理化学的性質】実験8の方法で調製したトレハロースの高純度標品を用いて理化学的性質を調べた。融点は97. 0°C、比旋光度は $[\alpha]^{20}_D +19.9^{\circ}$ ($c=5$)、融解熱は57. 8 KJ/mole、溶解度は25°Cの水に對し、無水物として77. 0 gであった。これらの物性値は、同時に測定した市販トレハロース含水結晶(光純業工業株式会社製)の値とよく一致した。

【0129】

【実験2.3 生体内での利用試験】厚治等が、「臨床栄養」、第41巻、第2号、第200乃至208頁(1972年)で報告している方法に準じて、実験8において調製した高純度トレハロース標品(純度99. 8%) 30.0 gを20w/v%水溶液とし、これをボランティア35名(健康な26才、27才、30才の男性)にそれぞれ

経口投与し、経時に採血して、血糖値及びインスリン値を測定した。対照としては、グルコースを用いた。その結果、トレハロースは、グルコースの場合と同様の挙動を示し、血糖値、インスリン値とともに、投与後、約0.5乃至1時間で最大値を示した。トレハロースは、容易に消化吸収、代謝利用されて、エネルギー源になることが判明した。従って、本発明の方法で得られるトレハロース及びこれを含む糖質は、エネルギー補給用糖源として好適である。

【0130】

【実験24 急性毒性試験】マウスを使用して、火災例A-6において調製した高純度トレハロース含水結晶を経口投与して急性毒性試験を行った。その結果、トレハロースは低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、そのLD₅₀値は、5.0 g/kg以上であった。

【0131】

【実験25 培養法によるトレハロース生成に与えるマルトース濃度の影響】マルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物を、マルトースを2乃至20w*

* / v % 含有せしめた栄養培地に培養し、培養物中のトレハロース収量に与えるマルトース濃度の影響を調べた。

培養方法は、ビメロバクター・スピーシーズ R48

(FERM BP-4315)の場合、栄養培地が、グルコース2.0w/v%の代わりに、別滅菌したマルトースを2乃至20w/v%を含有せしめた培地とした以外は、実験1と同様にファーメンターで27°C、7.2時間培養し、更に界面活性剤『Tween 40』を0.1v/v%加えて24時間培養を続けた。

培養物は、過心分離して、上清に含まれるトレハロース含量(mg/ml)をHPLCで測定した。結果は、表13に示す。

【0132】 【表13】

微生物	マルトース濃度(w/v%)	トレハロース含量(mg/ml)
ビメロバクター・スピーシーズ R48 (FERM BP-4315)	2	3.1
	5	20.6
	10	30.4
	15	9.8
	20	2.7
サーマス・アカティカス ATCC 33923	2	4.2
	5	22.5
	10	34.6
	15	8.1
	20	2.0

【0133】表13の結果から明らかなように、栄養培地中のマルトースが濃度20w/v%以下、望ましくは1.5w/v%以下、更に望ましくは5乃至10w/v%付近でトレハロース収量が高く、トレハロース生産に好適であることが判明した。

【0134】以下、本発明のマルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物を利用してしたトレハロース、又はこれを含む糖質の製造方法を実施例1で、トレハロース、又は、これを含む糖質を含有せしめた組成物を火災例Bで示す。

【0135】

【実施例A-1】濃度10%馬鈴薯澱粉液(pH5.

5)にα-アミラーゼ(ナガセ生化工業株式会社製『スピターゼ H.S.』)を澱粉グラム当たり2単位加えて攪拌下、加热糊化・液化させ、直ちにオートクレープ

(120°C)を20分間行った後、温度50°C、pH5.0に調整した。これにβ-アミラーゼ(ナガセ生化工業株式会社製)を澱粉グラム当たり20単位及びイソアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製)を澱粉グラム当たり500単位の割合になるように加えて24時間反応させ、次いで、95°Cに加热して酵素を失活させ、過濾、脱色して、マルトース含量約9.2%の糖液を得た。糖液としては、グルコース2.0w/v%の代わりに、前述の糖液を別滅菌して固形物当たり10w/v%を使用した以外は、実験1の方法に準じて調製した栄養培地をファーメンターにとり、これにマルトース・トレハロース変換酵素産生能を有するビメロバクター・スピーシーズ R48 (FERM BP-4315)の種培養物を1v/v%植菌し、実験1と同様に27°Cで7.2時間通気搅拌培養し、更に、界面活性剤(アルキルフェ

ノール・ボリオキシユチレンエーテル、和光純薬工業株式会社販売『Triton X-100』を0.2v/v%加えて培養を24時間続けた。この培養物を濾過して不溶物を除去し、得られる濾液を、9.5℃に加熱して酵素を失活させた後、濃縮し、常法に従って活性炭で脱色・濾過し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度約70%のシラップを固形物当たり約6.5gの收率を得た。本品は、固形物当たりトレイロースを内4.4%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、安定剤、賦形剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0136】

【実施例A-2】実施例A-1の方法で得た培養物の滤液に、固形物グラム当たり10単位のグルコアミラーゼ、ナガセ生化学工業株式会社製『グルコチーム』をpH5.0、50℃で24時間作用させ、次いで、加热失活、脱色、脱塩精製して得られる糖液を原糖液とし、トレイロースの含量を高めるため、ナトリウム強接着性カチオン交換樹脂（東京有機化学工業株式会社製『XT-1016』架橋度4%）を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径5.4cmのジャケット付きステンレス製カラム4本に充填し、直列につなぎ、樹脂層全長20mとした。カラム内温度60℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して、5/v%加え、これに60℃の温水をSV0.15で流して分画し、グルコースを除去し、トレイロース高含有画分を採取した。更に、精製、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、トレイロース高含有粉末を固形物当たり、約3.5%の收率を得た。本品は、トレイロースを約9.7%含有しており、極めて低い還元性、まるやかで上品な甘味を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0137】

【実施例A-3】実施例A-2の方法で得たトレイロース高含有画分を、常法に従って、活性炭で脱色し、イオン交換樹脂により脱塩して精製した溶液を濃度約70%に濃縮した後、助磨機にとり、秤量としてトレイロース含水結晶約2%を加えて徐冷し、晶出率約45%のマスクットを得た。本マスクットを乾燥塔上のノズルより150kg/cm²の高压にて噴霧した。これと同時に85℃の熱風を乾燥塔の上部より送風して底部に設けた移送金網コンベア上に捕集し、コンベアの下より4.5℃の温風を送りつつ、金網コンベア上に捕集した結晶粉末を乾燥塔外に徐々に移動させ取り出した。この取り出した結晶粉末を、熟成塔に充填して温風を送りつゝ10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、トレイロース含水結晶粉末を原料のトレイロース高含有糖液に対して固形物当量90%の收率を得た。本品は、実質的に吸湿性

を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、安定剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0138】

【実施例A-4】実施例A-2の方法で得たトレイロース高含有画分を、実施例A-3と同様に精製し、次いで、蒸発釜にとり、減圧下で煮詰め、水分約3.0%のシラップとした。次いで、助磨機に移し、これに種品として無水結晶トレイロースをシラップ固形物当たり1%加え、120℃で攪拌助磨し、次いで、アルミ製パットに取り出し、100℃で6時間品出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎し、流動乾燥して、水分約0.3%の無水結晶トレイロース粉末を、原料のトレイロース高含有糖液に対して、固形物当たり約8.5%の收率を得た。本品は、食品、化粧品、医薬品、その原材料、又は加工中間物などの含水物の脱水剤としてののみならず、上品な甘味を有する白色粉末状物質としても、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0139】

【実施例A-5】濃度3.3%とうもろこし澱粉乳に炭酸カルシウムを0.1%加えた後、pH6.5に調整し、これにα-アミラーゼ（ノボ社製『タマミール60L』）を澱粉グラム当たり0.2%加え、9.5℃で15分間反応させた。その反応液をオートクレーブ（120℃）を30分間行った後、55℃に冷却し、これにイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉グラム当たり500単位及びβ-アミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製）を澱粉グラム当たり30単位加え、4.8時間反応させ、次いで、9.5℃に加熱して酵素を失活させ、濾過、脱色して、マルトース含有約84%の糖液を得た。糖源として、前述の糖液を別減菌して固形物当たり10w/v%を追加した以外は、実験9の方法に準じて調製した栄養培地をファーメンターにとり、これにマルトース・トレイロース変換酵素産生能を有するショードモナス・ブチダ H262（FERM BP-4579）の種培養物を1v/v%植菌し、実験9と同様に27℃で4.8時間通気攪拌培養し、更に、界面活性剤『Tween 40』を0.2v/v%加えて24時間培養を続けた。この培養物を濾過して不溶物を除去し、得られる濾液を、9.5℃に加熱して酵素を失活させた後、濃縮し、常法に従って活性炭で脱色・濾過し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度約70%のシラップを固形物当たり約50%の收率を得た。本品は、固形物当たりトレイロースを約6.4%を含有しており、低還元性、温和な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、各種飲食物、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0140】

【実施例A-6】実施例A-5の方法で得たシラップを

濃度約80%に濃縮して助晶機にとり、種晶としてトレハロース含水結晶粉末約1%を加え、攪拌しつつ徐冷、品出させた。次いで、バスケット型遠心分離機で分離し、結晶を少量の水でスプレーし、洗浄して高純度トレハロース含水結晶を固体物当たり約20%の収率を得た。本品は、実験2と同様の理化学的性質を示し、甘味料、呈味改良剤、呈味改良剤、安定剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの各種組成物、更に工場試薬、工業原料、化学原料などに有利に利用することも有利に実施できる。

【0141】

【実施例A-7】濃度10%とうもろこし穀粉乳(pH 5.5)にアーミラーゼ『スピターゼHS』を澱粉グラム当たり2単位加えて搅拌下、加熱糊化・液化させ、直ちにオートクレープ(120℃)を20分間行った後、温度5.5℃、pH 5.0に調整した。これにイソアミラーゼ(株式会社林原生物化学研究所製)を澱粉グラム当たり300単位及びB-アミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社製)を澱粉グラム当たり20単位の割合になるように加えて24時間反応させ、次いで、9.5℃に加熱して酵素を失活させ、濾過、脱色して、マルトース含有量約9.2%の糖液を得た。糖源として、前述の糖液を別滅菌して固体物当たり1.0W/v%を追加した以外は、実験1の方法に準じて調製した栄養培地をフーメンターにより、これにマルトース・トレハロース・アーミラーゼを有するサーマス・アクアティカストCC

33923の種培養物を1v/v%補植し、実験1と同様に6.0℃で40時間恒温搅拌培養し、更に、界面活性剤『Triton X-100』を0.1v/v%及び培養液11当り卵白リブリゾーム50mgを加えて16時間培養を続けた。この培養物を過濾して不溶物を除去し、得られる濁液を、9.5℃に加熱して酵素を失活させた後、濃縮し、常法に従って活性炭で脱色・濃縮し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱脂して精製し、更に濃縮して濃度約70%のシラップを固体物当たり約5.5%の収率を得た。本品は、固体物当たりトレハロースを約6.8%含有しており、温和な甘味、濃度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、安定剤、賦形剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0142】

【実施例A-8】実施例A-7の方法で得たシラップを濃度約8.5%に濃縮して助晶機にとり、種晶約1%を混合した後、バットにとり、20℃で4日間静置して品出固化させ、次いで刃削機にて粉碎し、乾燥して合成型トレハロース含水結晶粉末を固体物当たり約9.5%の収率を得た。本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0143】

【実施例A-9】実施例A-7の方法で得たシラップを濃度約8.0%に濃縮して助晶機にとり、実施例A-6と同様に品出、分離して高純度のトレハロース含水結晶を固体物当たり約20%の収率を得た。本品は、実験2と同様の理化学的性質を示し、実施例A-6と同様に、各種飲食物、化粧品、医薬品などの各種組成物、更には、工業試薬、工業原料、化学原料などに有利に利用できる。

【0144】

【実施例B-1 甘味料】実施例A-3の方法で得たトレハロース含水結晶粉末1重量部に、α-アーモニカルテビオンド(東洋精糖株式会社販売『αGスイート』)0.1重量部及びL-アスパルチル-L-フェニルアラニンジメチルエステル(味の素株式会社販売『アスパルチーム』)0.01重量部を均一に混合し、顆粒成型機にかけて、顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約2倍の甘味度を有し、甘味度当たりカロリーは、蔗糖の約1/2に低下している。本甘味料は、それに配合した高甘味度甘味物の分解もなく、安定性に優れており、低カロリー甘味料として、カロリー摂取を制限している肥満者、糖尿病者などのための低カロリー飲食などに対する甘味付けに好適である。また、本甘味料は、虫歯誘発菌による酸の生成が少なく、不溶性グルカンの生成も少ないとおり、虫歯を抑制する飲食などに対する甘味付けにも好適である。

【0145】

【実施例B-2 ハードキャンディー】濃度5.5%蔗糖溶液100重量部に実施例A-1の方法で得たトレハロース含有シラップ3.0重量部を加熱混和し、次いで減圧下で水分2%未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸1重量部及び適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成型し、製品を得た。本品は、齒切れ、爽味良好で、蔗糖の晶出、変形も起ららない高品質のハードキャンディーである。

【0146】

【実施例B-3 チョコレート】カカオペースト4.0重量部、カカオバター1.0重量部、蔗糖3.0重量部、実施例A-6の方法で得た高純度トレハロース含水結晶2.0重量部を混合してレファイナーに通して粒度を下げた後、コンチョに入れて50℃で2昼夜練り上げる。この間に、レシチン0.5重量部を加え、充分に混和分散させた。次いで、温度調節機で31℃に調節し、バターの固まる直前に型に流し込み、振動機でアワ抜きを行い、10℃の冷却トンネルを20分間くぐらせて固化させた。これを型抜きして包装し製品を得た。本品は、吸湿性がなく、色、光沢共によく、内部組織も良好で、口中でなめらかに溶け、上品な甘味とまろやかな風味を有する。

【実施例B-4 チューラインガム】ガムベース3重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに蔗糖4重量部及び実施例A-3の方法で得たトレハロース含水結晶粉末3重量部を加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。本品は、テクスチャー、風味とも良好なチューラインガムである。

【0148】

【実施例B-5 加熱練乳】原乳100重量部に実施例A-5の方法で得たトレハロース含有シラップ3重量部及び蔗糖1重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度70%に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。本品は、温かな甘味で、風味もよく、乳幼児食、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

【0149】

【実施例B-6 乳酸菌飲料】脱脂粉乳175重量部、実施例A-2の方法で得たトレハロース高含有粉末80重量部及び特開平4-281795号公報で開示されているラクトスクロース高含有粉末5重量部を水1、200重量部に溶解し、65℃で30分間殺菌し、40℃に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスター^ターを30重量部種蔵し、3.7℃で8時間培養して乳酸菌飲料を得た。本品は、風味良好な乳酸菌飲料である。また、本品は、オリゴ糖を含有し、乳酸菌を安定に保持するだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用をも有する。

【0150】

【実施例B-7 粉末ジュース】噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末33重量部に対して、実施例A-6の方法で得た高純度トレハロース含水結晶50重量部、蔗糖10重量部、無水クエン酸0.65重量部、リンゴ酸0.1重量部、L-アスコルビン酸0.1重量部、ケン酸ソーダ0.1重量部、ブルラン0.1重量部、粉末香料適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にしてこれを流動層造粒機に仕込み、排風温度40℃とし、これに、実施例A-5の方法で得たトレハロース高含有シラップをパンダーとしてスプレーし、30分間噴霧し、計量、包装して製品を得た。本品は、果汁含有率約30%の粉末ジュースである。また、本品は異味、異臭がなく、長期に安定であった。

【0151】

【実施例B-8 カスタードクリーム】コーンスター^チ100重量部、実施例A-1の方法で得たトレハロース含有シラップ100重量部、マルトース80重量部、蔗糖20重量部及び食塩1重量部を充分に混合し、卵黄280重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳1、000重量部を徐々に加え、更に、これを火にかけて攪拌を続け、コーンスター^チが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。本品は、

なめらかな光沢を有し、温かな甘味で美味しい。

【0152】

【実施例B-9 ういろうの素】米粉90重量部に、コーンスター^チ20重量部、蔗糖40重量部、実施例A-3の方法で得たトレハロース含水結晶粉末80重量部及びブルラン4重量部を均一に混合してういろうの素を製造した。ういろうの素と適量の抹茶と水とを混ぜし、これを容器に入れて60分間蒸し上げて抹茶ういろうを製造した。本品は、照り、口当たりも良好で、風味も良い。また、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良い。

【0153】

【実施例B-10 あん】原料あずき10重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、渋切り、あく抜きして、水溶性夾雜物を除去して、あづきつぶを約21重量部を得た。この生あんに、蔗糖14重量部、実施例A-7の方法で得たトレハロース含有シラップ5重量部及び水4重量部を加えて煮沸し、これに少量化したサラダオイルを加えてつぶあんをこわさないように練り上げて、製品のあんを約3重量部得た。本品は、色焼けもなく、舌ざわりもよく、風味良好で、あんぱく、まんじゅう、だんご、もなか、水菓などのあん材料として好適である。

【0154】

【実施例B-11 パン】小麦粉100重量部、イースト2重量部、砂糖5重量部、実施例A-2の方法で得たトレハロース高含有粉末1重量部及び無機フード0.1重量部を、常法に従って、水でこね、中種を26℃で2時間発酵させ、その後30分間熟成し、焼き上げた。本品は、色相、すだちともに良好で適度な彈力、温かな甘味を有する高品質のパンである。

【0155】

【実施例B-12 ハム】豚もも肉1,000重量部に食塩15重量部及び硝酸カリウム3重量部を均一にすり込んで、冷室に1昼夜堆積する。これを水500重量部、食塩100重量部、硝酸カリウム3重量部、実施例A-2の方法で得たトレハロース高含有粉末40重量部及び香辛料からなる塩漬液に冷室で7日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、煙煙し、タッキングし、冷却包装して製品を得た。本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

【0156】

【実施例B-13 粉末ベプチド】濃度40%食品用大豆ペプチド溶液(不二製油株式会社製「ハイニュートS」)1重量部に、実施例A-6の方法で得た高純度トレハロース含水結晶2重量部を混合し、プラスチック製パットに入れ、50℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。本品は、風味良好で、ブレミックス、冷菓などの製菓用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用糞便剤などとしても有利に利用できる。

50 【0157】

【実施例B-14 粉末味噌】赤味噌1重量部に実施例A-4の方法で得た無水結晶トレハロース粉末3重量部を混合し、多数の半球状凹部を設けた金属板に流し込み、これを室温下で一夜静置して固化し、塑型して1個当たり約4gの小形味噌を得、これを粉碎機にかけて粉末味噌を得た。本品は、即席ラーメン、即席吸物などの調味料として有利に利用できる。また、圓形味噌は、圓形調味料としてだけでなく味噌菓子などとしても利用できる。

【0158】

【実施例B-15 粉末卵黄】生卵から調製した卵黄をプレート式加熱殺菌機で60乃至64℃で殺菌し、得られる液状卵黄1重量部に対して、実施例A-4の方法で得た無水結晶トレハロース粉末4重量部の割合で混合した後パットに移し、一夜放置して、トレハロース含水結晶に変換させてプロックを調製した。本プロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄を得た。本品は、プレミックス、冷凍、乳化剤などの製造用材料としてのみならず、経口流動食、経管流動食などの離乳食、治療用栄養剤などとしても有利に利用できる。また、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

【0159】

【実施例B-16 化粧用クリーム】モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-2の方法で得たトレハロース高含有粉末2重量部、α-アーチゴシルルチン1重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリル10重量部及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレンジグリコール5重量部及び精製水6重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

【0160】

【実施例B-17 粉末薬用人参エキス】薬用人参エキス0.5重量部に実施例A-4の方法で得た無水結晶トレハロース粉末1.5重量部を混捏した後、パットに移し、2日間放置してトレハロース含水結晶に変換させプロックを調製した。本プロックを切削機にかけて粉末化し、分級して粉末薬用人参エキスを得た。本品を適量の配合

第2リン酸カルシウム	4.5. 0重量部
ブルラン	2. 9. 5重量部
ラウリル硫酸ナトリウム	1. 5重量部
グリセリン	2. 0. 0重量部
ポリオキシエチレンソルビタンラウレート	0. 5重量部
防腐剤	0. 0. 5重量部
実施例A-8の方法で得たトレハロース含水結晶粉末	1. 2. 0重量部
マルチトール	5. 0重量部

ビタミンB1及びビタミンB2粉末とともに顆粒成型機にかけ、ビタミン含有顆粒状薬用人参エキスとした。本品は、疲労回復剤、強壮、強筋剤などとして有利に利用できる。また、育毛剤などとしても利用できる。

【0161】

【実施例B-18 固体製剤】ヒト天然型インターフェロン- α 標品（株式会社林原生物化学研究所製）を、常法に従って、固定化抗ヒトインターフェロン- α 抗体カラムにかけ、該標品に含まれるヒト天然型インターフェロン- α を吸着させ、安定剤であるウシ清アルブミンを素通りさせて除去し、次いで、pHを変化させて、ヒト天然型インターフェロン- α を実施例A-6の方法で得た高純度トレハロース含水結晶を5%含有する生理食塩水を用いて溶出した。本液を精密過滤し、約200倍量の無水結晶マルトース粉末、株式会社林原商事販売『ファイントース』に加えて脱水、粉末化し、これを打錠機にて打錠し、1錠（約200mg）当たりヒト天然型インターフェロン- α を約1.50単位含有する錠剤を得た。本品は、舌下錠などとして、一日当たり、大人1乃至10錠程度が経口的に投与され、ウイルス性疾患、アレルギー性疾患、リューマチ、糖尿病、悪性腫瘍などの治療に有利に利用できる。とりわけ、近年、患者数の急増しているエイズ、肝炎などの治療剤として有利に利用できる。本品は、本発明の非還元性糖質と無水結晶マルトースが共に安定剤として作用し、室温で放置してもその活性を長期間よく維持する。

【0162】

【実施例B-19 糖衣錠】重量1.50mgの素錠を芯剤とし、これに実施例A-9の方法で得た高純度トレハロース含水結晶40重量部、ブルラン（平均分子量20万）2重量部、水3.0重量部、タルク2.5重量部及び酸化チタン3重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約2.30mgになるまで糖衣し、次いで、同じトレハロース含水結晶粉末6重量部、ブルラン1重量部及び水3.4重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢のある外観の優れた糖衣錠を得た。本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

【0163】

【実施例B-20 練歯磨】

上記の材料を常法に従って混合し、練歯磨を得た。本品は、適度の甘味を有しており、特に子供用練歯磨として好適である。

【0164】

【実施例B-2-1 流動食用固体製剤】実施例A-6の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶500重量部、粉末卵黄270重量部、脱脂粉乳209重量部、塩化ナトリウム4、4重量部、塩化カリウム1、8重量部、硫酸マグネシウム4重量部、チアミン0、01重量部、アスコルビン酸ナトリウム0、1重量部、ビタミンEアセテート0、6重量部及びニコチン酸アミド0、04重量部からなる配合物を調製し、この配合物25グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。本品は、1袋分を約150m乃至300mlの水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへ経管的使用方法により利用され、生体へのエネルギー補給に有利に利用できる。

【0165】

【実施例B-2-2 輸液剤】実施例A-6の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶を水に濃度約10w/v%に溶解し、次いで、常法に従って、精密滴過してパイロジエンフリーとし、プラスチック製ボトルに無菌的に充填し施栓して製品を得た。本品は、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などに投与するのに好適である。本品は濃度10w/v%で血液と等張で、グルコースの場合の2倍濃度でエネルギー補給できる。

【0166】

【実施例B-2-3 輸液剤】実施例A-9の方法で製造した高純度トレハロース含水結晶と下記の組成のアミノ酸配合物がそれぞれ5w/v%、30w/v%になるように水に混合溶解し、次いで実施例B-2-2と同様に精製してバイロジエンフリーとし、更に、プラスチック製パックに充填し施栓して製品を得た。

アミノ酸配合物の組成 (mg/1000ml)

L-イソロイシン	180
L-ロイシン	410
L-リジン塩酸塩	620
L-メチオニン	240
L-フェニルアラニン	290
L-レスオニン	180
L-トリプトファン	60
L-バリン	200
L-アルギニン塩酸塩	270
L-ヒスチジン塩酸塩	130
グリシン	340

本品は、糖質とアミノ酸との複合輸液剤にもかかわらず、トレハロースが還元性を示さないため、経日変化もなく安定な輸液剤で、静脈内、腹腔内などへ投与するのに好適である。本品は、生体へのエネルギー補給のみな

らず、アミノ酸補給のために有利に利用できる。

【0167】

【実施例B-2-4 外傷治療用膏薬】実施例A-8の方法で製造したトレハロース含水結晶粉末200重量部及びマルトース300重量部に、ヨウ素3重量部を溶解したメタノール50重量部を加え混合し、更に10w/v%ブルラン水溶液200重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。本品は、ヨウ素による殺菌作用のみならず、トレハロースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから、治癒期間が短縮され、効率もきれいに治る。

【0168】

【発明の効果】上記から明らかなように、マルトースを含有せしめた栄養培地に、マルトース・トレハロース変換酵素産生能を有する微生物を培養することにより、培養液から非還元性糖質を極めて簡便、短時間に製造することができることとなり、トレハロース、又は、これを含む糖質の工業的な製造を容易にする。また、マルトー

スとして、澱粉を液化した溶液にβ-アミラーゼ又はβ-アミラーゼとともに澱粉枝接酵素を作用させて得られるマルトースを利用すれば、澱粉からのトレハロース収量を著しく高め、その工業的な製造を容易にする。このようにして得られるトレハロース又はこれを含む糖質は、安定性に優れ、良質で上品な甘味を行っている。また、経口摂取により消化吸収され、カロリー源となる。とりわけ、トレハロースは非経口的にも使用され、よく代替利用される。従って、本発明のトレハロース、又は、これを含む糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0169】本発明の確立は、安価で無限の資源である澱粉から、從来望むべくして容易に得られなかったトレハロース、又は、これを含む糖質を工業的に大量かつ安価に提供できる全く新しい道を拓くこととなり、それが与える影響は、食品、化粧品、医薬品業界は言うに及ばず、農水産業、化学工業にも及びこれら産業界に与える工業的意義は計り知れないものがある。

【図面の簡単な説明】

40 【図1】ビメロバクター・スピーシーズ R 4 8 のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図2】ビメロバクター・スピーシーズ R 4 8 のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図3】ビメロバクター・スピーシーズ R 4 8 のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図4】ビメロバクター・スピーシーズ R 4 8 のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

影響を示す図である。

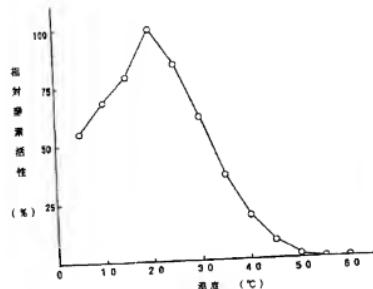
【図5】シードモナス・ブチダ H 2 6 2 のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図6】シードモナス・ブチダ H 2 6 2 のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図7】シードモナス・ブチダ H 2 6 2 のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図8】シードモナス・ブチダ H 2 6 2 のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

【図1】



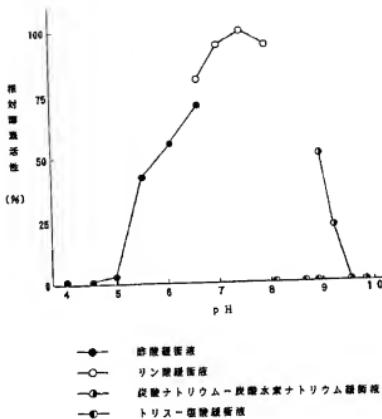
【図9】サーマス・アクアティカス ATCC 3392 のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図10】サーマス・アクアティカス ATCC 3392 のマルトース・トレハロース変換酵素の酵素活性に及ぼすpHの影響を示す図である。

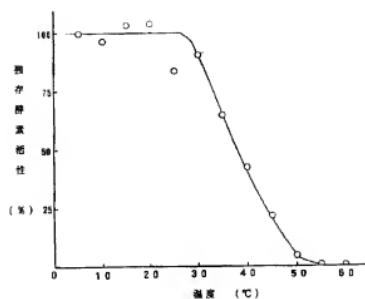
【図11】サーマス・アクアティカス ATCC 3392 のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図12】サーマス・アクアティカス ATCC 3392 のマルトース・トレハロース変換酵素の安定性に及ぼすpHの影響を示す図である。

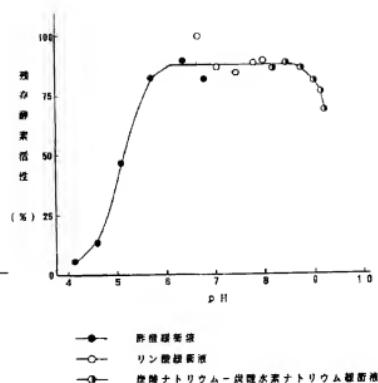
【図2】



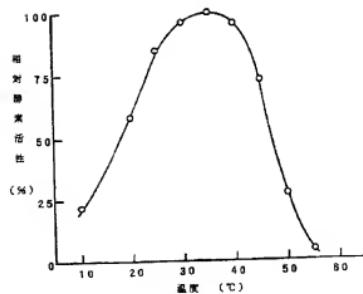
【図3】



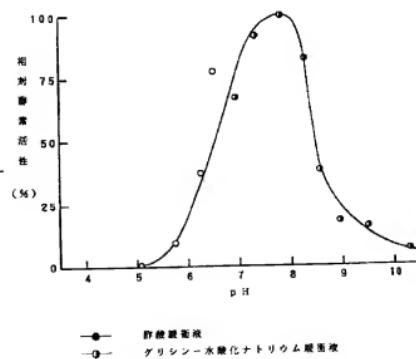
【図4】



【図5】

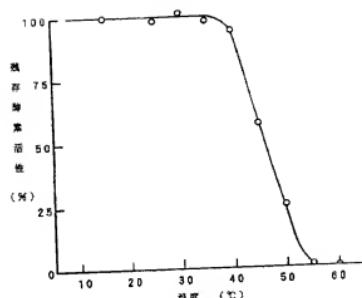


【図6】

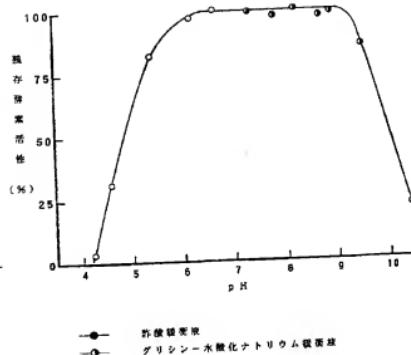


(27)

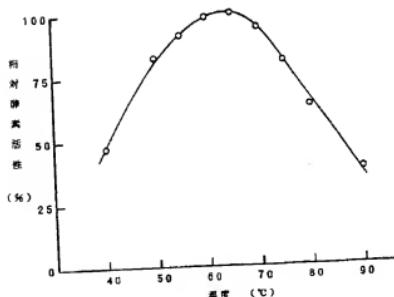
【図7】



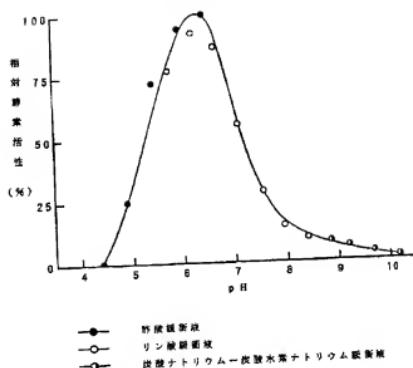
【図8】



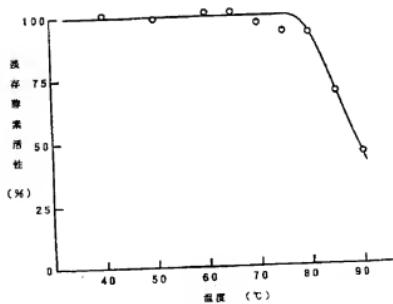
【図9】



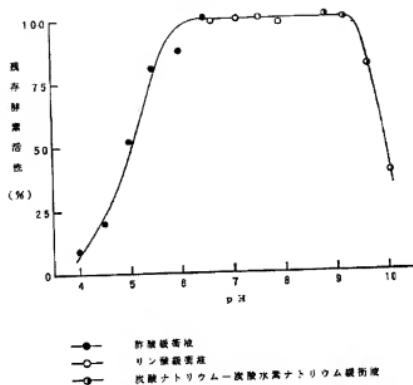
【図10】



【図11】



【図12】



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第1部門第1区分
【発行日】平成13年12月11日(2001.12.11)

【公開番号】特開平9-9986
【公開日】平成9年1月14日(1997.1.14)

【年次号】公開特許公報9-100
【出願番号】特願平7-204033

【国際特許分類第7版】

C12P 19/16

A23L 1/236

A61K 7/00

C07H 3/04

C12P 19/20

【F I】

C12P 19/16

A23L 1/236 A

A61K 7/00 F

C07H 3/04

C12P 19/20

【手続補正】

【提出日】平成13年7月3日(2001.7.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正内容】

【0049】品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性などを失かない各種生理活性物質又はこれを含む健康食品・医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、ツモア・ネクロシス・ファクター- β 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスクアーファクター、インターロイキン-1などのリンホカイン、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン、B C Gワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質、チアミン、リボフラビン、L-アースカルビン酸、肝油、カルチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン、リバーゼ、エラスターーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの糖素、薬用人参エキス、スッポンエキス、ケラレラエキス、アロエエキス、ブロボリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの

の生菌、ローヤルゼリーなどの各種生理活性物質も、その有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状又は固状の健康食品や医薬品などに容易に製造できることとなる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0066

【補正方法】変更

【補正内容】

【0066】これらの溶液に、実験2の方法で得た精製マルトース・トレハロース変換酵素を基質固形物グラム当たりそれぞれ2単位ずつ加え、基質濃度を5w/v%になるよう調製し、これを20°C、pH 7.0で24時間作用させた。酵素反応前後の反応液をメルク社製『キーゼルゲル60』(アルミニートレーラー、20×20cm)を用いた薄層クロマトグラフィー(以下、TLCと略称する)にかけ、それぞれの糖質に対する酵素作用の有無を確認した。TLCは展開溶媒に1-ブタノール：ピリジン：水=6:4:1(容積比)を用い、室温で1回展開した。発色は20%硫酸-メタノール溶液を噴霧し、110°Cで10分間加热しておこなった。結果を表2に示す。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0135

【補正方法】変更

【補正内容】

【0135】

【実施例A-1】濃度10%馬鈴薯澱粉乳（pH 5.5）に α -アミラーゼ（ナガセ生化工業株式会社製『スピターゼ HS』）を澱粉グラム当たり2単位加えて攪拌下、加熱糊化・液化させ、直ちにオートクレーブ（120℃）を20分間行った後、温度50℃、pH 5.0に調整した。これに β -アミラーゼ（ナガセ生化工業株式会社製）を澱粉グラム当たり20単位及びイソアミラーゼ（株式会社林生物化学研究所製）を澱粉グラム当たり500単位の割合になるように加えて24時間反応させ、次いで、95℃に加热して酵素を失活させ、濾過、脱色して、マルトース含量約92%の糖液を得た。糖源として、グルコース2.0w/v%の代わりに、前述の糖液を別滅菌して固体物当たり1.0w/v%を使用した以外は、実験1の方法に従じて調製した栄養培地をフーメンターにより、これにマルトース・トレハロース変換酵素産生能を有するビメバクター・スピーシーズ R 48 (FERM BP-4315) の種培養物を1v/v%植菌し、実験1と同様に27℃で72時間通気攪拌培養し、更に、界面活性剤（アルキルフェノール・ポリオキシエチレンエーテル、和光純薬工業株式会社販売『Triton X-100』）を0.2v/v%加えて培養を24時間続けた。この培養物を濾過して不溶物を除去し、得られる糖液を、95℃に加热して酵素を失活させた後、濃縮し、常法に従って活性炭で脱色・滤過し、II型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度約70%のシラップを固体物当たり約6.5%の收率で得た。本品は、固体物当たりトレハロースを約4.4%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性を有し、甘味料、呈味改良剤、

安定剤、賦形剤などとして各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0136

【補正方法】変更

【補正内容】

【0136】

【実施例A-2】実施例A-1の方法で得た培養物の濾液に、固体物グラム当たり10単位のグルコアミラーゼ、ナガセ生化工業株式会社製『グルコチーム』をpH 5.0、50℃で24時間作用させ、次いで、加热失活、脱色、脱塩精製して得られる糖液を原糖液とし、トレハロースの含混を高めるため、ナトリウム型強酸性カチオン交換樹脂（東京有機化学工業株式会社製『XT-1016』、架橋度4%）を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。樹脂を内径5.4cmのジャッケット付きステンレス製カラム4本に充填し、直列につなぎ、樹脂層全長20mとした。カラム内温度を60℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して、5v/v%加え、これに60℃の温水をSV0.15で流して分画し、グルコースを除去し、トレハロース高含有部分を採取した。更に、精製、濃縮し、真空乾燥し、粉碎して、トレハロース高含有粉末を固体物当たり、約3.5%の收率で得た。本品は、トレハロースを約9.7%含有しており、極めて低い還元性、まろやかで上品な甘味を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、賦形剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。